

Die geskiktheid van potwurms (*Enchytraeidae*) en plante om die toksisiteit van olieraffinadery-slik te toets



Authors:

Adriaan J. Reinecke¹Sophia A. Reinecke¹Mia van Wyk¹

Affiliations:

¹Department of Botany and
Zoology, Stellenbosch
University, South Africa

Corresponding author:

Mia van Wyk,

mia@millsanddotten.co.za

Dates:

Received: 27 March 2016

Accepted: 03 Oct. 2016

Published: 24 Nov. 2016

How to cite this article:

Reinecke, A.J., Reinecke, S.A.
& Van Wyk, M., 2016, 'Die
geskiktheid van potwurms
(*Enchytraeidae*) en plante om
die toksisiteit van
olieraffinadery-slik te toets',
*Suid-Afrikaanse Tydskrif vir
Natuurwetenskap en
Tegnologie* 35(1), a1382.
<http://dx.doi.org/10.4102/satnt.v35i1.1382>

Copyright:

© 2016. The Authors.

Licensee: AOSIS. This work
is licensed under the
Creative Commons
Attribution License.

Grondbewerking word in die petrochemiese nywerheid in suidelike Afrika gebruik as 'n metode om van besoedelstowwe ontslae te raak. 'n Historiese grondbewerkingsperseel is by 'n petroleumraffinadery geïdentifiseer waar die gedeponeerde slik uit 'n mengsel van olie en wateroplosbare chemiese besoedelstowwe bestaan wat verskeie gevaarlike chemikalieë insluit. Die doel met die studie was om die toksisiteit van die slik, sowel as grond, op die perseel te bepaal en vas te stel of plante en potwurms gebruik kan word in die bioassessering van die slik, aangesien daar 'n behoefte bestaan om 'n groter verskeidenheid toetsorganismes te gebruik wat verskillende ekologiese nisse verteenwoordig. Ons het eksemplare van 'n grondlewende potwurm (*Enchytraeus doerjesi*) aan die slik en aan slikbewerkte grond blootgestel en hulle oorlewing, groei, voortplantingsukses en vermydingsgedrag bestudeer. Vyf plantsoorte en hulle sade is aan verskillende konsentrasies van die slik in kommersiële potgrond blootgestel en hulle ontkiemingsukses, groeiakoers en biomassa is bepaal. Die grond van die landbewerkingsperseel was nie akuut toksies vir die potwurms nie en hulle het selfs 'n toename in voortplanting getoon in vergelyking met onbesoedelde grond. Hulle het wel in gedragstoets erg besoedelde grond vermy. Die bevinding is dat potwurms nie so gevoelig is vir die slik soos erdwurms en springsterre, wat voorheen getoets is nie, maar dat hulle wel bruikbaar is en kan bydra om die toksisiteit en herstelstatus van sulke grond te evalueer, aangesien hulle 'n bykomende ekologiese nis verteenwoordig. Die plante was nie baie gevoelig vir die slik nie en gemengde resultate is verkry. Slaai en gras is die meeste deur die slik geaffekteer, terwyl boontjies die beste gevaar het en hulle groeiakoers selfs deur die byvoeging van slik gestimuleer is.

The suitability of potworms (*Enchytraeidae*) and plants to test the toxicity of oil refinery sludge. Landfarming is used in southern Africa as a tool to dispose of contaminants in the petrochemical industry. A historically landfarmed site was identified at a petroleum refinery where the sludge deposited on the site consisted of a mixture of oil and water-soluble contaminants which included several hazardous chemicals. The aim of this study was to assess the toxicity of the sludge, as well as of soil from the landfarming site, and to determine if potworms and plants could be used in bioassays since there is a need to identify a variety of test species, representing different ecological niches. We exposed a soil-dwelling potworm (*Enchytraeus doerjesi*) to the sludge and the landfarming soil to study their survival, growth, reproduction success and avoidance behaviour. Five plant species and their seeds were exposed to different concentrations of sludge in potting soil, and consequently germination success, growth rate and biomass were monitored. The various soils from the landfarming site were not acutely toxic to the potworms and they even showed an increase in reproduction, compared to uncontaminated control soil. They avoided heavily contaminated soil from the landfarming site. We conclude that the potworms were not as sensitive as the earthworms and springtails previously tested. They may nevertheless still be utilised for testing the toxicity and recovery status of such soils, since they represent a different ecological niche and showed an avoidance response to refinery waste. The plants were not very sensitive to refinery sludge and presented mixed results. Lettuce and grass were affected most by the sludge, while beans were the most resistant. With the addition of low concentrations of sludge to the substrate, the growth rate of beans was even stimulated.

Inleiding

Toenemende nywerheidsontwikkeling lei tot 'n toename in afval wat besoedelstowwe bevat wat dikwels in grondbewerkingspersele beland. Die stowwe kan moontlik die toelaatbare agtergrondwaardes oortref en remediëring is dan nodig om die kontaminante te verminder. Sodoende kan die omgewingsimpak verlaag en die grondpersele weer voordelig benut word vir

Read online:



Scan this QR
code with your
smart phone or
mobile device
to read online.

ander doeleindes. Dit kan ook die besoedeling van grond- en oppervlaktwater voorkom (Rushton *et al.* 2007).

Die aktiwiteite van die olienyerwerheid genereer soliede afval wat verskeie chemiese stowwe bevat soos swaarmetale, vlugtige organiese verbindings (VOV's), polisikliese aromatiesekoolwaterstowwe (PAK's), houtpreserveermiddels (pentachloorfenool en kreosoot), oplosmiddels en totale petroleum koolwaterstowwe (TPK's) (Vidali 2001; Reinecke, Reinecke & Van Wyk 2015). Hierby is karsinogene, endokriene en metaboliese versteurders ingesluit (Carpenter, Arcaro & Spink 2002). Grondbewerking maak dit moontlik om van groot hoeveelhede afval ontslae te raak deur dit in die boonste grondlaag in te ploeg (Da Silva *et al.* 2014), waar biologiese afbraak deur grondorganismes en abiotiese prosesse kan plaasvind (Genou *et al.* 1994; Rubinos *et al.* 2007). Dit word as 'n eenvoudige en redelik kostedoeltreffende behandelingsmetode beskou (Pearce & Ollermann 1998).

Naas voordele het die grondbewerking van olieslik ook beperkinge. Die chemiese stowwe kan onder meer voordelige grondorganismes soos myte, erdwurms, potwurms, springsterte en verskeie ander wat in gesonde gronde voorkom, benadeel (Cermak *et al.* 2010; Reinecke *et al.* 2015). Loehr en Webster (1996) het aangetoon dat remediëring wel in grond kan plaasvind sodat die chemiese konsentrasies van sommige stowwe met verloop van tyd afneem, maar metodes is steeds nodig om die herstelstatus van sodanige grond te meet, asook om die toksisiteit van die afval self te meet. Die volhoubaarheid van die praktyk van grondbewerking is in gedrang indien grondkosstelsels en hulle funksies onomkeerbaar beskadig sou word. Chemiese analise van besoedelde grond op sigself verskaf nie 'n geïntegreerde beeld van die gekombineerde effekte van chemiese mengsels of hulle biobeskikbaarheid in die grond nie (Henner *et al.* 1997; Sverdrup *et al.* 2002; Lanno *et al.* 2004; Augulyte *et al.* 2008). Deur die reaksie van individuele organismes te ondersoek, kan 'n meer realistiese beeld van die toksiese risiko's verkry word. Gestandaardiseerde bioassesseringmetodes is beskikbaar vir hierdie doel, maar dit verteenwoordig nie noodwendig alle ekologiese nisse in die grondomgewing nie. Gevolglik is dit nodig dat ander spesies se potensiaal as toetsorganismes ook ondersoek word.

In Suid-Afrika is alle afvalverwerking onderhewig aan sekere reëls betreffende die hantering, klassifisering en wegdoening van gevaarlike afval soos bepaal deur die Departement van Waterwese en Bosbou (DWA 1998), maar geen bioassessering van grond wat afvalbewerking ondergaan het, word, soos in ander lande (bv. Nederland), voorgeskryf om die remediëringsukses te bepaal nie (Van Gestel *et al.* 2001). Vorige studies oor die giftigheid van oliebesoedelde grond het getoon dat die oorlewing en voortplanting van die erdwurmspesies *Eisenia fetida* en *E. andrei*, die voortplanting van die springstert (*Folsomia candida*), sowel as reaksies van plantspesies en mikroörganismes as sensitiewe eindpunte gebruik kan word om effekte van besoedelstowwe te meet (Dorn & Salanitro 2000; Chapman *et al.* 2012; Reinecke, Van

Wyk & Reinecke 2016). In hierdie studie gebruik ons vyf plant- en een potwurmspesie (Familie: *Enchytraeidae*) as toetsorganismes.

Potwurms leef in die detrituslaag van grond wat ryk is aan organiese materiaal (Spurgeon, Weeks & Van Gestel 2003) en word dus geredeliker blootgestel aan besoedelstowwe as die dieper lewende organismes soos erdwurms (Dawson *et al.* 2007). Die toksisiteit van baie besoedelstowwe soos olie, koolwaterstowwe en nywerheidstowwe is volgens Didden en Römcke (2001) grootliks onbekend, hoewel enkele studies wel in die onlangse tyd onderneem is met ander kontaminante om die potensiaal van potwurms in toksisiteitstoetse in natuurlike grond te bepaal (Kuperman *et al.* 2006).

Die wortelstelsels van plante wat in direkte aanraking is met besoedelstowwe in die grond speel volgens Adam en Duncan (1999) 'n belangrike rol in hulle vermoë om weerstand teen giftige stowwe te bied. Die koolwaterstowwe in olie beïnvloed grondvrugbaarheid en verander die samestelling van mikroörganismes in die grond wat weer plante se fisiologie en groei affekteer (Ogbo 2009). Alhoewel plante groter verdraagsaamheid het as invertebrate en mikrobies teen olie en koolwaterstowwe (Blankenship & Larson 1978; Dorn *et al.* 1998; Adam & Duncan 1999; Adam & Duncan 2002) word hulle wel geaffekteer en kan steeds as bio-indikatore dien van die kwaliteit van besoedelde grond en die vlak van remediëring. Veral verandering in ontkieming en groei bied nuttige indikatore van fisiologiese effekte, volgens Ogbo (2009).

Die doel van die studie was om by te dra tot die spektrum van organismes wat moontlik gebruik kan word om die toksisiteit en omgewingsimpak van slik uit 'n olieraffinadery te bepaal. Daarmee is eksperimenteel vasgestel of die response van potwurms en 'n verskeidenheid plantspesies vir dié doel gebruik kan word. Daarbenewens is die herstelstatus van 'n grondbewerkingsperseel wat oor verskeie jare van die slik ontvang het, ondersoek deur na die response van die organismes te kyk.

Materiaal en metodes

Veldperseel en monsterneming

'n Historiese grondbewerkingsperseel naby 'n binnelandse olieraffinadery is sowat 150 km suid van Johannesburg in Sasolburg se gebied, Suid-Afrika (26° 50' 8.35" S 27° 50' 45.61" O) geïdentifiseer waar ru-olie na petrol, diesel en paraffien geraffineer word. Die afval is 'n mengsel van stowwe wat as API-slik (*American Petroleum Institute sludge*) bekend staan (Shie *et al.* 2000; Punnaruttanakun *et al.* 2003). Die API-slik word in damme gepomp van waar dit in die grondbewerkingsperseel (5.9 ha) ingeploeg word tot 'n diepte van 200 mm. Die perseel bestaan uit 'n kleiner noordelike deel wat oor die jare meer slik ontvang het as die groter suidelike deel. Monsterneming op die perseel is in Mei 2009 ontwerp en uitgevoer deur van gestandaardiseerde metodes gebruik te maak om verteenwoordigende monsters te neem (Tan 2005; Reinecke *et al.* 2015). Die grond van die

perseel is voorheen chemies ontleed en daar is bevind dat die noordelike deel hoë konsentrasies van die dieselsekorganiese verbindings (DRO's), insluitende verskeie baie giftige, polisikliese, aromatiese koolwaterstowwe bevat. Die totale konsentrasie van DRO's in die noordelike deel van die perseel (1496 mg/kg) was bykans dubbel dié in die suidelike deel (675 mg/kg) (Reinecke *et al.* 2015). Afgesien van grond vanaf die grondbewerkingsperseel, is tien liter slik ook by ewekansige punte in die slikdam versamel, gemeng en in die laboratorium in 'n vrieskas geberg vir gebruik in die blootstellingtoetse in die verskillende substrate soos aanbeveel deur OECD (2004a).

Grond van die noordelike en suidelike dele van die perseel is afsonderlik gehou en goed gemeng en gesif ten einde groter klippe en plantmateriaal te verwyder. Grondmonsters is ook op 'n naby geleë perseel versamel om te dien as verwysingsgrond sonder enige resente geskiedenis (van meer as 'n dekade, aldus die personeel) van blootstelling aan nywerheids- of landbou-aktiwiteit.

Omdat verskillende grondkomponente soos klei, sand en organiese materiaal die biobeskikbaarheid van toksikante vir opname deur organismes kan beïnvloed, is twee bykomende verwysings- of kontroleterreine se grond gebruik nl. kunsmatige OECD-grond en LUFA2.2-grond soos deur gestandaardiseerde toetse voorgeskryf word (Römbke *et al.* 2006). Die OECD-grond het bestaan uit 35% fyn sand, 35% growwe sand (Consol [Pty.] Ltd., Suid-Afrika), 20% kaolienklei (Serina Kaolin [Pty.] Ltd., Suid-Afrika) 10% Sphagnumveen (<1 mm) (Nirom Peat Moss Inc., Kanada).

Die natuurlike grond, bekend as LUFA2.2, is vanaf Speyer, Duitsland ingevoer en gebruik omdat riglyne vir gestandaardiseerde toksisiteitstoetse aanbeveel dat natuurlike grond met bekende eienskappe ook gebruik moet word (Römbke *et al.* 2006). Parameters soos pH en grondvog is gemeet en gekontroleer soos beskryf deur Reinecke *et al.* (2015). Waterretensie, voginhoud en waterhoukapasiteit (WHK) is met 'n elektroniese Sartoriusvogmeter, model MA45 bepaal. Organiese materiaalinhoud is volgens die Walkley-Black-metode bepaal (Tan 2005). Tekstuurontledings is met behulp van die hidrometermetode (Day 1956; Van der Watt 1966) bepaal. Tien liter API-slik is ewekansig by verskillende punte in die slikdam versamel, gemeng en in die toksisiteitstoetse in die laboratorium gebruik om kontrole- of verwysingsgrond te kontamineer sodat 'n positiewe kontrole sowel as 'n negatiewe kontrole ooreenkomstig die OECD protokolle (OECD 2004a) verkry is.

Toetsorganismes

Potwurms (*Enchytraeus doerjesi*) (Westheide & Graefe 1992) kom voor in die organiese ryk, boonste grondlae en speel 'n belangrike rol in ontbindings- en grondbewerkingsprosesse (Beylich & Achazi 1999; Memis, Çelikkale & Ercan 2004). Potwurms plant vinnig voort by temperatuur bokant 8 °C tot 10 °C en groei optimaal by temperatuur van 15 °C tot 21 °C

(Römbke & Moser 2002; Memis *et al.* 2004). Die spesie teel maklik onder beheerde toestande en voortplanting word as bruikbare eindpunt vir toksisiteitstoetse beskou (Kramarz, Zwolak & Laskowski 2005). Die potwurms is in die Departement Plant- en Dierkunde, US, in kommersieel beskikbare potgrond geteel en weekliks met rou hawermout (Jungle oats™, Tiger brands, Suid-Afrika) gevoer. Volwasse (klitellate) wurms is vir die bioassesserings met behulp van 'n stereomikroskoop geselekteer.

Eksperimentele toestande

Die potwurms is vir drie weke blootgestel volgens die riglyne van die OECD (OECD 2004b). Vyf rondeboomflesse (100 mL) is elk met 30 g droë toetsgrond gevul, van geperforeerde deksels voorsien en vir twee dae gelaat om te stabiliseer. Tien volwasse potwurms is daarna in elke fles geplaas en voedsel is aanvanklik en daarna weekliks voorsien deur 50 mg fyn hawermout in die grondbolaag in te werk. Op Dag 21 is 10 mL absolute etanol (95%) in elke fles gevoeg en na een minuut is 100 mL H₂O bygevoeg en dit geskud terwyl die grond geleidelik oorgegooi is in 250 mL-plastiekhouers. Daarna is 200 µL van 'n 1% Bengaalsrooioplossing ($M_r = 1017.65$ g/mol) bygevoeg en gemeng. Die grond is oornag by 4 °C gehou en daarna is alle eksemplare van die kleiner grondeeltjies afgewas deur van 'n sif (0.088 mm-maasgrootte) gebruik te maak. Wurms wat op die sif agtergebly het, is na 'n plat wit bord (80 cm × 60 cm × 30 cm) met water oorgedra. Die pienk gekleurde volwassenes is getel en verwyder en die kleiner, juveniele wurmpies is getel deur van 'n ligbron en vergrootglas gebruik te maak.

Alle blootstellings is in 'n donker klimaatkamer by 20 °C gedoen. Die grond is tot 50% van die maksimum waterhouvermoë benut en die pH is aan die begin en einde van die eksperiment gemeet. Die konsentrasiereeks van slik (%) is verkry deur die byvoeging en meng van die slik (massa: massa) met die substrate nl. verwysingsperseelgrond: 0; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 4 en 5; OECD-grond: 1; 2; 3; 4 en 5; en LUFA2.2-grond: 0; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 4 en 5.

Potwurms is in voorlopereksperimente in duplikaat vir twee weke aan hierdie drie substrate blootgestel, asook aan konsentrasies van 0.5, 1, 2.5 en 5% API-slik in elkeen van die substrate (tien eksemplare in elk) om 'n geskikte konsentrasiebereik vas te stel vir die finale bioassesserings met slik-konsentrasiereekse in die drie verskillende substrate. Die blootstelling aan konsentrasiereekse is gebruik om die letale konsentrasie vir 50% (LK₅₀) oorlewing en die effektiewe konsentrasie vir 50% (EK₅₀) voortplanting vir elke blootstellingsreeks te bereken.

Potwurms is ook aan grond van die noordelike en suidelike deel van die betrokke perseel blootgestel, sowel as aan positiewe kontroles van 1% en 3% API-slik in OECD-grond en die getal oorlewende volwassenes en juveniele het in alle gevalle as eindpunte van oorlewing en voortplanting gedien.

Vermydingsgedrag

Toetse soortgelyk aan dié wat deur Reinecke *et al.* (2015) vir erdwurms beskryf is, is uitgevoer in rondeboom-plastiekhouders (9 cm radius en hoogte van 18 cm, met oppervlak van 1781 cm²) deur die flesse in twee gelyke dele met 'n plastiektussenskot te verdeel. Elke afdeling is met 30 g van die spesifieke substraat gevul in die volgende kombinasies: (1) Verwysingsperseelgrond aan beide kante (negatiewe kontrole), (2) verwysingsperseelgrond versus noordperseelgrond, (3) verwysingsperseelgrond versus suidperseelgrond, (4) verwysingsperseelgrond versus verwysingsperseelgrond + 3% API-slik (positiewe kontrole) en (5) verwysingsperseelgrond versus OECD-grond.

Die tussenskot is daarna verwyder en 20 volwasse organismes op die middellyn tussen die twee substrate geplaas. Die houders is met geperforeerde deksels toegemaak en by 20 °C vir 48 h in die donker gelaat. Daarna is die tussenskot in die middel teruggeplaas, die substrate verwyder en die getal potwurms bepaal met behulp van 'n ligbron en vergrootglas. Vyf replikate is vir elke blootstelling uitgevoer.

Plantblootstellings

Om die fitotoksiteit van olieraffinadery-slik te toets, is vyf plantsoorte aan 'n konsentrasiereeks van slik in kommersiële potgrond blootgestel, en saadontkieming, saailinggroei, bioamassaverandering en wateropname is nagegaan.

Die volgende plante is in die studie gebruik: Boontjie (*Phaseolus vulgaris*), 'n dikotiele peulgewas soos voorgestel deur Eriyamremu *et al.* (2007), mielies (*Zea mays*) as verteenwoordiger van 'n snelgroeiende monokotiel met 'n bywortelstelsel wat nie diep in die grond indring nie, slaai (*Lactuca sativa*) waarvan die blare 'n hoë waterinhoud het en waarvan die meganisme van wateropname van die ander soorte verskil, radys (*Raphanus sativus*) wat 'n groot, ondergrondse stoororgaan het en relatief min bogrondse groei (Perez & Gallardolara 1986), gras (*Pennisetum clandestinum*) wat 'n digte wortelstelsel het en beskou word as 'n goeie absorbeerder van toksikante (Adam & Duncan 1999).

'n Konsentrasiereeks van 0.5%, 2.5%, 5%, 10 en 25 API-slik en 'n negatiewe kontrole van ongekontameneerde grond (0% API-slik) is gebruik. Grond en slik is op 'n basis van massa: massa deeglik gemeng om 'n homogene mengsel te verkry wat vir twee dae gelaat is voordat die onderskeie sade geplant is.

Die konsentrasiereeks is gebruik om ontkiemingsukses van al vyf plantspesies te bepaal. Tien sade is per Petri-bakkie in 'n inkubator by 22 °C blootgestel en gereeld met gedistilleerde water klam gehou, en vir sewe dae is die ontkieming twee keer per dag gemoniteer.

Vyf saailinge per spesie is vanaf elke houer in plastiekhouders in die onderskeie substrate oorgeplant en in 'n kweekhuis

geplaas onder beheerde toestande sodat groei gemoniteer kan word. Die plante is gereeld nat gehou en elke individuele plant se hoogte drie maal per week gemeet vanaf die grondoppervlak tot by die punt van die stingel in die geval van die boontjies, of tot by die punt van die blaar in die geval van die mielies, radyse, slaai en gras. Die boontjies en mielies se blootstelling is na vier weke getermineer, terwyl die radys, slaai en gras se blootstellings na drie weke gestaak is. Daarna is die plante verwyder, gewas en verdeel en is die nat massa van die bogrondse en ondergrondse dele afsonderlik bepaal. Die plante is daarna vir 48 h in papiersakke in 'n oond gedroog by 40 °C. Daarna is die droë massas van die onderskeie dele bepaal en die waterinhoud bereken.

Statistiese analises

Data is vir normaliteit getoets deur van Statistica® 9-sagteware gebruik te maak (StatSoft 2010) deur toepassing van die Shapiro-Wilktoets (waar die waarskynlikheidsfaktor $p \leq 0.05$ nieparametriese data en $p \geq 0.05$ parametrisiese data aandui).

Waar die meervoudigheid van parametrisiese data vergelyk is, is ANOVA (*One-way Analysis of Variance*) uitgevoer met die Tukey-posttoets om verskillende toestande te vergelyk. In die geval van nieparametriese data is Kruskal-Wallis ANOVA's met Dunn se meervoudige vergelyking gebruik met statistiese waarskynlikheid as $p \leq 0.05$.

In die vermydingstoetse is die getal organismes in die toets- en kontrolegrond vergelyk met die tweerigting-t-toets. Vermydning van die toetsgrond het plaasgevind indien die organismes se vermyding daarvan betekenisvol meer as 0.50 (50%) was. Vermydingsgedrag groter as 80% is beskou as 'n aanduiding van toksiteit (Yeardley, Lazprchak & Gast 1996; Hund-Rinke *et al.* 2003; Natal-Da-Luz, Römbke & Sousa 2008).

EK₅₀-waardes vir die toetse met potwurms is bereken deur van sigmoidale dosisrespons-krommes gebruik te maak (Haanstra, Doelman & Oude Voshaar 1985) met statistiese sagteware van SPSS® 18.0 (PASW 2009) en GraphPad Prism® 5.00 sagteware (GraphPad 2007). Die LK₅₀ vir API-slik is met die Spearmann-Kärber model (Hamilton, Russo & Thurston 1977) bepaal.

Resultate van die plantblootstellings is ook met Statistica® 9 (StatSoft 2010) en GraphPad Prism® 5.00 (GraphPad 2007) ontleed en veranderlikes is vir normaliteit getoets met die Shapiro-Wilk-toets. Ontkiemingsukses (%) is teenoor tyd uitgestip om die verband tussen konsentrasies van die slik en die response van die plante in verhouding tot die kontroles te bepaal. Die groei- en massaveranderinge is bereken oor periodes van 14 dae vir boontjies en mielies, en 10 dae vir slaai, radys en gras. Vergelykings is gedoen met behulp van eenrigting-ANOVA's met die post hoc Tukey-toets (vir parametrisiese data) en met die Kruskal-Wallis ANOVA's met Dunn se post hoc toets (vir nieparametriese

data. Die laagste waarneembare effekonsentrasie (LWEK) (Eng. 'LOEC of lowest observed effect concentration') en GWEK (geen waarneembare effekonsentrasie) (Eng. 'NOEC of no observed effect concentration') is met behulp van die rekenaarprogram ToxRat Professional (ToxRat® 2003) bereken, gebaseer op die protokol van die OECD-riglyn 208 (OECD 2006).

Resultate

Oorlewing en voortplanting van *E. doerjesi* in slikbewerkte grond

Die eienskappe van die substrate wat in die studie gebruik is, was dieselfde as wat Reinecke *et al.* (2015) gebruik het en word nie weer volledig herhaal nie, maar wel weergegee waar dit in die bespreking ter sake is.

Die voorlopige toetse met die potwurms in die drie verwysingsgrondtipes het getoon dat voortplanting wel na twee tot drie weke plaasgevind het. Tabel 1 vat die resultate saam van die oorlewing en voortplanting van die potwurms in die verskillende substrate. Hoewel groot variasie voorgekom het, het die wurms die grootste getalle nakomelinge in die gekontameneerde grond van die noordelike en suidelike dele van die bewerkingsperseel geproduseer, wat statisties betekenisvol ($p < 0.05$) meer was as in die ongekontameneerde OECD-grond en verwysingsperseelgrond. Baie soortgelyke voortplantingskoerse het in die verwysingsperseelgrond en in die gekontameneerde verwysingsperseelgrond voorgekom wat heelwat laer was as in die OECD-grond. Daar was geen statisties betekenisvolle verskille wat oorlewing in die verskillende substrate betref nie.

Oorlewing en voortplanting van *E. doerjesi* in 'n konsentrasiereeks van slik

Oorlewing van *E. doerjesi* in konsentrasiereekse van API-slik in drie verskillende substrate word in Tabel 2 saamgevat. Die voortplanting in grond van die verwysingsperseel (Figuur 1) was laer by hoër konsentrasies slik (4% en 5%). Geen betekenisvolle mortaliteit het voorgekom nie en die LK_{50} is nie bereken nie.

Die EK_{50} vir voortplanting is bereken as 26 550 mg/kg (2.66%). Potwurms wat vir drie weke blootgestel is aan

grond van die verwysingsperseel, wat met 2.5% slik gekontamineer is, het betekenisvol ($p < 0.05$) minder juveniele geproduseer as potwurms in dieselfde ongekontameneerde grond.

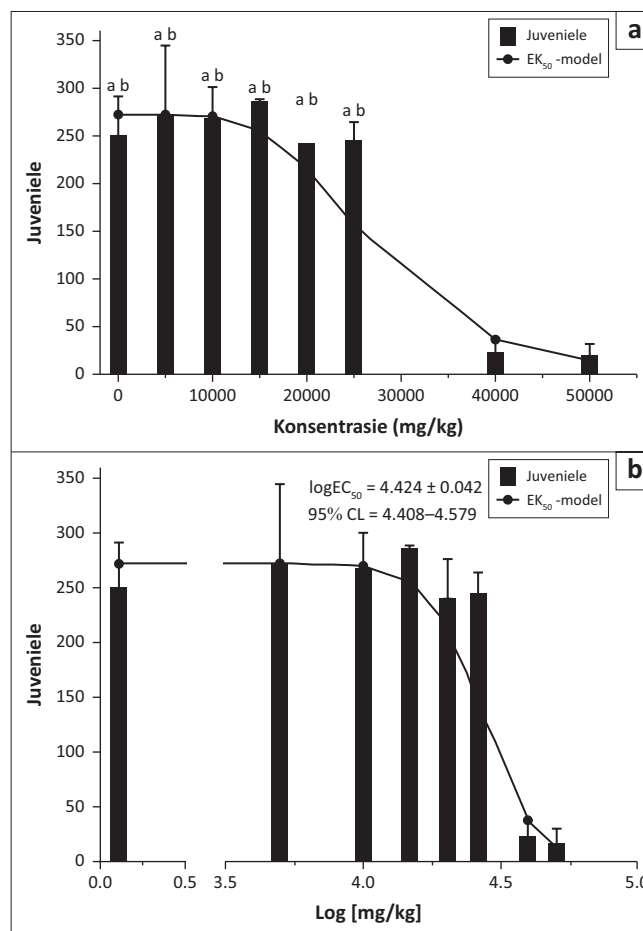
Potwurms wat aan 'n slik-konsentrasiereeks in OECD-grond blootgestel is (Figuur 2) het 'n LK_{50} hoër as 5% gehad. 'n Statisties betekenisvolle afname in voortplanting het by 'n konsentrasie van 3% slik en hoër voorgekom. Die EK_{50} was 24 874 mg/kg (2.5%) API-slik.

TABEL 2: Gemiddelde % oorlewing (\pm standaardafwyking) van vyf replikate per substraattipe (10 wurms per replikaat) *Enchytraeus doerjesi*-eksemplare vir drie weke blootgestel aan 'n konsentrasiereeks van API-slik in verskillende substrate.

| % Slik | LUFA-grond | OECD-grond | Verwysingsgrond |
|--------|--------------------------|-------------|-----------------|
| 0 | 90 \pm 13 ^a | 100 \pm 0 | 100 \pm 0 |
| 0.5 | 100 \pm 0 ^a | - | 100 \pm 0 |
| 1 | 93 \pm 13 ^a | 92 \pm 18 | 100 \pm 0 |
| 1.5 | 100 \pm 0 ^a | 93 \pm 13 | 100 \pm 0 |
| 2 | 92 \pm 16 ^a | 100 \pm 0 | 95 \pm 0 |
| 2.5 | 95 \pm 21 ^a | - | 84 \pm 6 |
| 3 | 90 \pm 10 ^a | 94 \pm 09 | - |
| 4 | 80 \pm 14 | 88 \pm 22 | 80 \pm 18 |
| 5 | 56 \pm 9 | 92 \pm 8 | 100 \pm 4 |

Nota: Slegs in LUFA-grond is statisties betekenisvolle verskille ($p \leq 0.05$) aangedui met:

^a, waar response met dié in 5% slik vergelyk is.



Nota: Statisties betekenisvolle verskille ($p \leq 0.05$) waar alle konsentrasies vergelyk is met: (a) 50 000 mg/kg en (b) 40 000 mg/kg API-slik.

FIGUUR 1: (a) Gemiddelde (\pm standaardafwyking) van getal juveniele wat deur *Enchytraeus doerjesi* in die konsentrasiereeks van API-slik in verwysingsperseelgrond oor 'n periode van drie weke geproduseer is; (b) 'n logaritmiëse skaal vir berekening van EK_{50} vir berekening van juvenieleproduksie.

TABEL 1: Gemiddelde persentasie oorlewing (\pm standaardafwyking) en gemiddelde getal juveniele geproduseer (\pm standaardafwyking) van vyf replikate per substraattipe (10 wurms per replikaat) van *Enchytraeus doerjesi* wat vir 3 weke aan verskillende substrate blootgestel is.

| Toetssubstrate | Gemiddelde oorlewing | Gemiddelde juveniele |
|--|----------------------|-------------------------------------|
| Verwysingsperseelgrond (-kontrole) | 84 \pm 15 | 57 \pm 34.39 |
| OECD-grond (-kontrole) | 100 \pm 0 | 175.75 \pm 56.03 ^a |
| Noordperseelgrond | 92 \pm 13 | 339.75 \pm 76.92 ^{a,b,c} |
| Suidperseelgrond | 86 \pm 31 | 414.00 \pm 17.78 ^{b,c} |
| 1% slik in verwysingsgrond (+kontrole) | 78 \pm 25 | 40.33 \pm 25.54 ^b |

Nota: Statisties betekenisvolle verskille ($p \leq 0.05$) word aangedui waar dit:

^a, vergelyk word met die verwysingsperseelgrond.

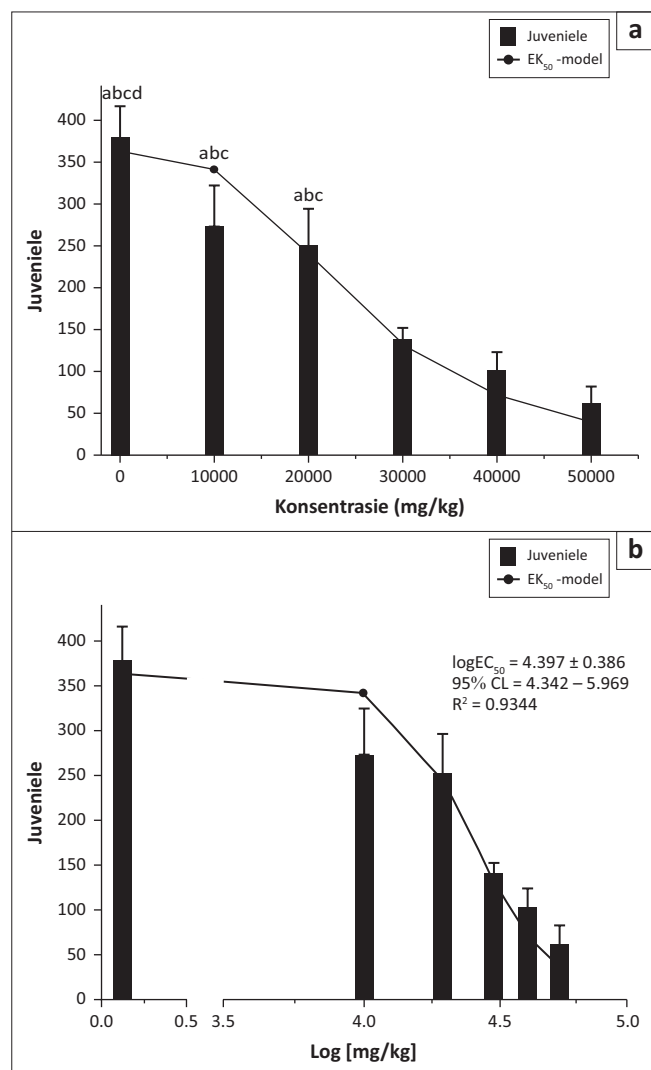
^b, vergelyk met OECD-grond.

^c, vergelyk word met 1% slik in verwysingsgrond.

Die resultate van die blootstelling van *E. doerjesi* aan 'n konsentrasiereeks van API-slik in LUFA2.2-grond word in Figuur 3 geïllustreer. Slegs by 5% API-slik was daar 'n statisties betekenisvolle ($p < 0.05$) afname in oorlewing. Die LK_{50} was 5.35% (95% sekerheidsvlak: onderste 4.71%, boonste 6.07%) of 53 mg/kg slik. Die EK_{50} vir voortplanting was 3.6% of 35 mg/kg API-slik.

Vermydingsgedrag van *Enchytraeus doerjesi*

Die potwurms het die meer gekontameneerde noordperseelgrond vermy (statisties betekenisvol, $p < 0.05$) in vergelyking met die verwysingsgrond (Tabel 3). Die potwurms het die gekontameneerde suidperseelgrond ook bo die grond van die verwysingsperseel verkies. Hulle het vermydingsgedrag van meer as 80% teenoor die verwysingsgrond met 1% API-slikkontaminasie getoon. Hulle het ook OECD-grond bo die grond van die verwysingsperseel verkies.

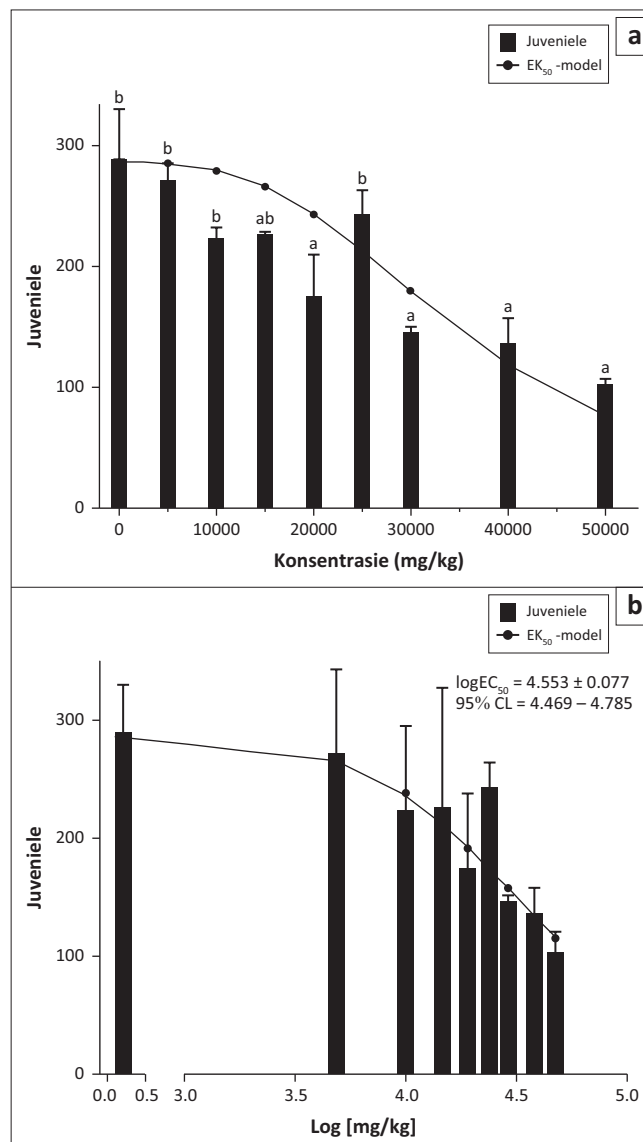


Nota: Statisties betekenisvolle verskille ($p \leq 0.05$) waar alle konsentrasies vergelyk is met: (a) 50 000 mg/kg, (b) 40 000 mg/kg, (c) 30 000 mg/kg, en (d) 20 000 mg/kg API-slik.

FIGUUR 2: (a) Gemiddelde (\pm standaardafwyking) van getal juveniele deur *E. doerjesi* in die konsentrasiereeks van API-slik geproduseer in OECD-grond oor 'n periode van 3 weke. (b) 'n Logaritmiëse skaal vir berekening van EK_{50} vir juvenieleproduksie.

Ontkiemingsukses van plante

Ontkiemingsukses van die onderskeie sade word grafies in Figuur 4 voorgestel. Boontjies het na sewe dae 'n sukseskoers bo (Figuur 4a) 80% in alle substrate getoon waar API-slik toegevoeg is, behalwe by 10% API-slik waar die eerste ontkeiming eers na vier dae waargeneem is en die ontkeimingsukses laer was as by ongekontameneerde grond. Mieliesaad het 'n ontkeimingskoers bo 80% in alle grond met slik getoon (Figuur 4b). Slaai (Figuur 4c) het 'n lae ontkeimingskoers gehad en slegs 50% van die saad in grond sonder slik het ontkeim. Radyse (Figuur 4d) het 'n hoër ontkeimingskoers getoon in grond met 0.5%, 2.5% en 10% API-slik (>70%) as in grond sonder slik. (40%). In grond met 5% API-slik was dit slegs 20%. Grassaad (Figuur 4e) het na slegs twee dae ontkeim in grond met 10% API-slik, maar die finale ontkeimingsukses was slegs 20%. Die hoogste



Nota: Statisties betekenisvolle verskille ($p \leq 0.05$) waar alle konsentrasies vergelyk is met: (a) 0 mg/kg (kontrolegrond) en (b) 50 000 mg/kg API-slik.

FIGUUR 3: (a) Gemiddelde (\pm standaardafwyking) van getal juveniele deur *E. doerjesi* in die konsentrasiereeks van API-slik geproduseer in LUFA2.2-grond oor 'n periode van drie weke; (b) 'n Logaritmiëse skaal vir berekening van EK_{50} vir juvenieleproduksie.

TABEL 3: Vergelyking van die vermydingsgedrag van *E.doerjesi* (potwurm) met dié van *Eisenia andrei* (erdwurm) en *Folsomia candida* (springstert) in dieselfde substrate (gemiddeld \pm standaardafwyking) naamlik verwysingsperseelgrond (A) met verskillende substrate (kant 2).

| Kant 1 | Substraat | Persentasie (Gemiddeld \pm Standaardafwyking) organismes in die behandelingkant 2) | | |
|----------|-----------------|--|-------------------------------|---------------------------|
| | Kant 2 | <i>Eisenia Andrei</i> † | <i>Enchytraeus doerjesi</i> ‡ | <i>Folsomia candida</i> § |
| A versus | A (kontrole) | 51.56 \pm 17.95 | 62.67 \pm 24.88 | 49.06 \pm 18.61 |
| A versus | Noordperseel | 42.19 \pm 31.20 | 35.00 \pm 20.54* | 60.91 \pm 11.58 |
| A versus | Suidperseel | 45.31 \pm 20.01 | 68.19 \pm 14.42* | 60.29 \pm 15.57 |
| A versus | A + 1% API-slik | 12.50 \pm 17.68 | 11.50 \pm 7.20* | 15.93 \pm 12.71 |
| A versus | OECD-grond | - | 62.00 \pm 17.89 | 78.62 \pm 9.08 |

Bron: Van Wyk, M., 2010: 'Evaluating the toxic effects of industrial waste from a historic landfarming site using bioassays', unpublished M.Sc.dissertation, University of Stellenbosch, Stellenbosch; Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., Van Wyk, M., 2015, 'Kan die gevoeligheid van grondlewende organismes gebruik word om die toksisiteit van olierafinadery afval te beoordeel?' SA Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie 34(1) 76–89. <http://dx.doi.org/10.4102/satnt.v34i1.1308>

†, n = 32; ‡, n = 100; §, n = 50.

Nota: Vir potwurms dui die asterisk* betekenisvolle verskille ($p < 0.05$) aan tussen kante.

ontkiemingskoers (40%) was by 2.5% slik. Geen saad van enige plantsoort het by 25% API-slik ontkiem nie.

Groeikoers van plante

Die groeikoers van die saailinge (Figuur 5) wat aan slik blootgestel is, het heelwat verskil tussen die blootstellingkonsentrasies en tussen die verskillende plantspesies. Boontjies wat aan 2.5% API-slik in potgrond blootgestel is, het 'n statisties beduidende hoër ($p < 0.05$) groeikoers gehad as dié in die potgrond met konsentrasies van 0% en 0.5% API-slik. Met die uitsondering van boontjies waar die groeikoers met toenemende konsentrasies slik toegeneem het, het alle ander plantsoorte óf nie sodanige verskille getoon nie óf die neiging was die teenoorgestelde. Die groeikoers in die ongekontameneerde grond was in die meeste gevalle beduidend hoër as in die slikblootstellings. 'n Paar slaaisaailinge het by die 0.5%, 2.5% en 5% blootstellingsgroepe doodgegaan en almal by 10% slik na 15 dae van blootstelling.

Biomassaverandering en wateropname van saailinge

Die totale toename in droë massa, bogrondse massa (stamme en blare) en ondergrondse massa (wortels) van saailinge wat aan die konsentrasiereekse van slik blootgestel is, word in Figuur 5 weergegee. Die totale droë massa van die boontjieplante in 0% en 0.5% API-slik was statisties betekenisvol laer as in die 2.5% konsentrasie (Figuur 5a). Die LWEK vir boontjies was meer as 10% slik. Saailinge by alle slikblootstellings in die potgrond het 'n beduidend laer totale droë massa gehad in vergelyking met saailinge wat aan ongekontameneerde potgrond (0% API-slik) blootgestel is. Die slaaisaailinge wat aan 0.5% slik blootgestel is, het 'n verlies in totale biomassa getoon teenoor dié in ongekontameneerde potgrond. Slegs slaai wat aan 10% API-slik in grond blootgestel is, het 'n statisties betekenisvolle laer ($p < 0.05$) totale droë massa as in die ongekontameneerde potgrond getoon (Figuur 5c). Die LWEK was minder as 0.5%. Die totale droë massa van radyse was betekenisvol hoër in ongekontameneerde potgrond in vergelyking met alle ander blootstellings aan slik (Figuur 5d).

Lae ondergrondse, totale droë massa het by alle saailinge na blootstellings aan slik voorgekom in vergelyking met die bogrondse droë massa. Die LWEK vir radyse (vir totale droë massa) was minder as 0.5%. Slegs die grassaailinge (Figuur 5e) het in ongekontameneerde potgrond (0% API-slik) 'n bogrondse

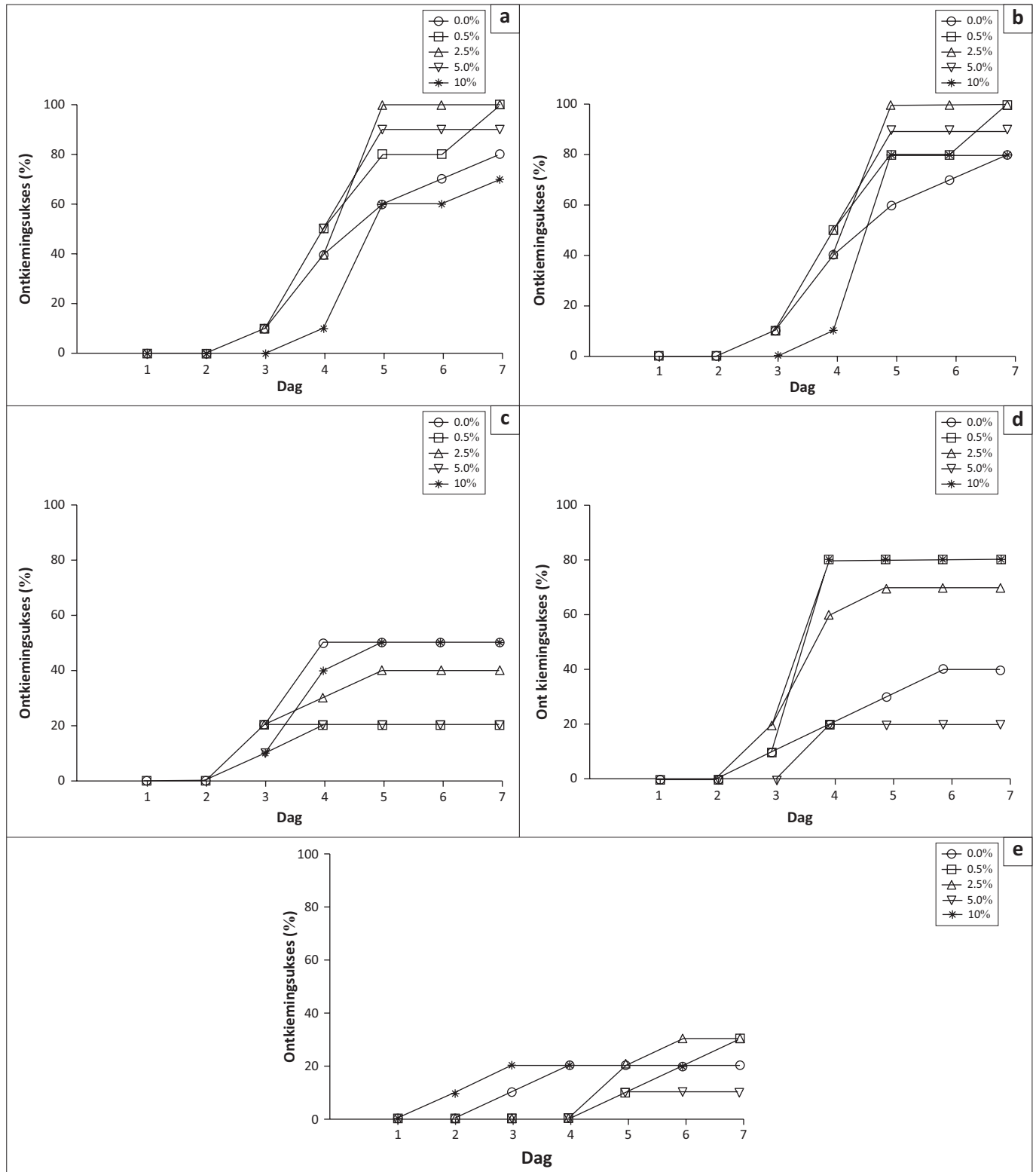
droë massa bereik wat statisties betekenisvol hoër was as dié van al die ander saailinge wat aan verskillende konsentrasies van slik blootgestel is. Die LWEK vir gras was 10% API-slik. In Tabel 4 word die gemiddelde waterinhoud van die verskillende soorte saailinge weergegee nadat hulle aan die onderskeie slikkonsentrasies in potgrond blootgestel. Geen liniêre toenames of afnames is waargeneem met blootstelling aan toenemende konsentrasies nie, en gevolglik kon geen EK_{50} bereken word nie.

Bespreking

Potwurms se response

Oorlewing van die potwurms (Tabel 1) was laer in die verwysingsgrond as in die OECD-grond en, betekenisvol ($p < 0.05$) minder juveniele is in die verwysingsgrond as in die OECD-grond geproduseer (Figuur 1, 2 en 3). Dit kan moontlik daarop dui dat die verwysingsgrond, wat as kontrole gedien het, nie baie geskik was vir die doel nie. Die lae organiese inhoud van die grond in vergelyking met die OECD-grond kon 'n belangrike rol gespeel het, aangesien die potwurms normaalweg in grond voorkom wat ryk is aan organiese materiaal (Beylich & Achazi 1999; Memis *et al.* 2004). In die positiewe kontrole (1% API-slik in die verwysingsgrond) het oorlewing en juveniele produksie nie statisties betekenisvol verskil van die ongekontameneerde verwysingsgrond nie. Dit dui daarop dat die potwurms nie besonder sensitief vir die slik was nie. Die uitvoer van identiese eksperimente onder sover moontlik eenderse toestande, maar op verskillende tye, het nogtans vir baie variasie gesorg.

E. doerjesi het na drie weke van blootstelling (Tabel 2) meer as dubbel die getal juveniele opgelewer in die gekontameneerde noord- en suidgrond (339.75 ± 76.92 en 414.00 ± 17.78 onderskeidelik) as in die verwysingsgrond (57 ± 34.39) en OECD-grond (175.75 ± 56.03 juveniele). Dit dui daarop dat die eindpunt nie baie gevoelig is vir die meting van die slik se toksisiteit in landbewerkte grond nie. Die waargenome verskil kan dalk verband hou met die verskil in organiese materiaalinhoud (4.4% en 2.6% respektiewelik) in die slikbewerkte grondsoorte teenoor slegs 0.4% in die verwysingsgrond. Die produksie van juveniele *E. doerjesi* was egter selfs hoër in die landbewerkte grond as in die OECD-grond wat 'n heelwat hoër organiese inhoud gehad het sodat dit nie die enigste bepalende faktor kon gewees

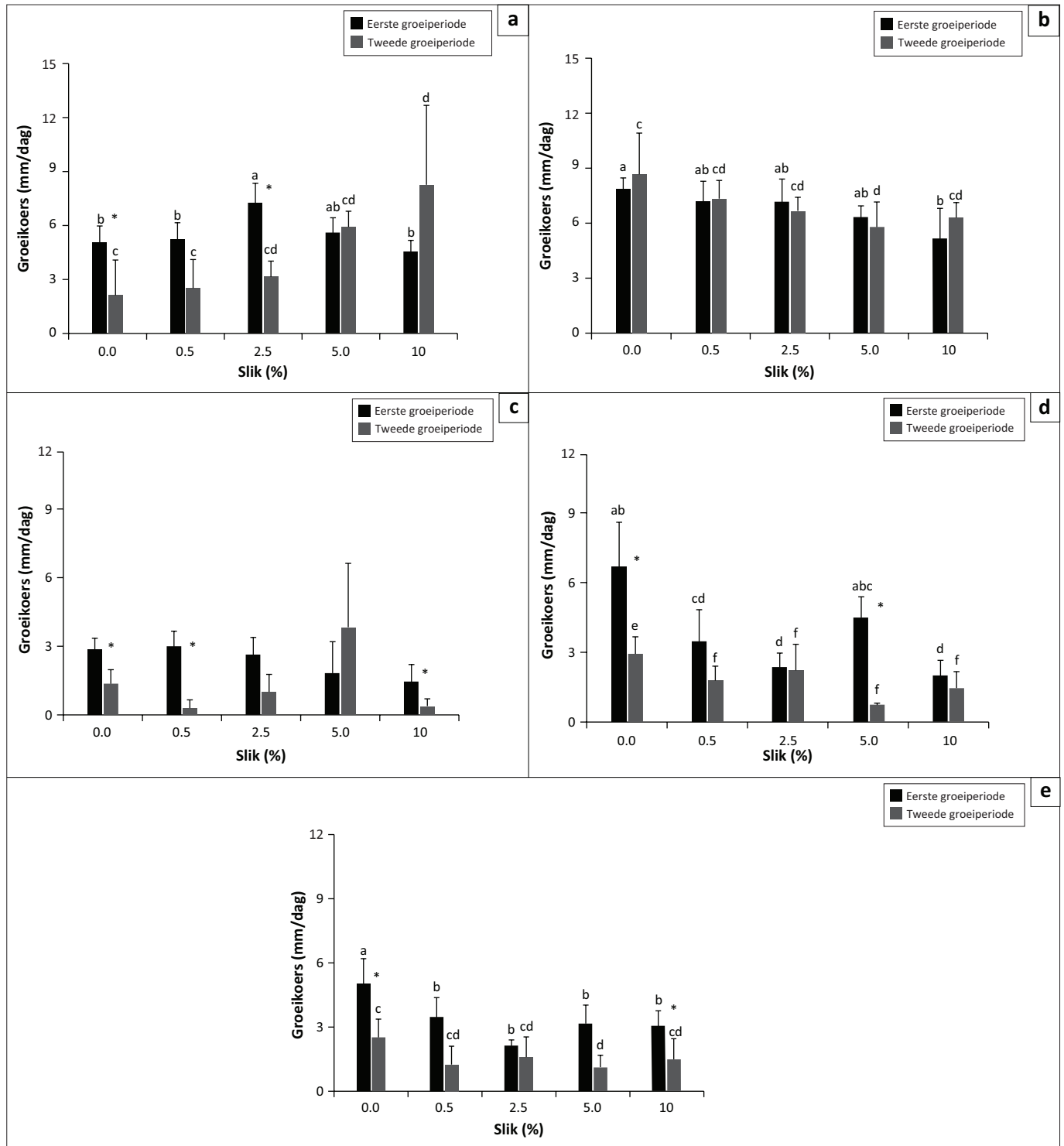


FIGUUR 4: Ontkiemingsukses (%) van die sade van vyf plantsoorte: (a) *Phaseolus vulgaris* (boontjies); (b) *Zea mays* (mielies); (c) *Lactuca sativa* (slaai); (d) *Raphanus sativus* (radys) en (e) *Pennisetum clandestinum* (gras), wat vir sewe dae aan 'n konsentrasiereeks van API-slik in potgrond blootgestel is.

het nie. Daarbenewens was die aard en beskikbaarheid (vir opname) van die organiese materiaal nie bekend nie en kon dit steeds 'n rol gespeel het om die waargenome verskille te veroorsaak. Bioremediëring van die perseel deur belugting en toevoeging van kunsmis het vroeër plaasgevind en dit kon die grondeienskappe verander en mikrobiële aktiwiteit verhoog het. *E. doerjesi* voed ook op mikroörganismes en

hulle getalle is heel waarskynlik hoër in natuurlike grond as in kunsmatige OECD-grond (Didden 1992).

Oorlewering in die konsentrasiereekse van slik in verwysingsgrond, OECD- en LUF2.2-grond was tussen 90 en 100% (Tabel 1) en die GWK was in alle gevalle hoër as die konsentrasies wat in die reeks gebruik is. Die EK_{50} s vir



Nota: Verskillende letters toon betekenisvolle verskille ($p < 0.05$) aan tussen behandelings.

*, dui gevalle aan waar die eerste groeiperiode van die plante betekenisvol van die tweede verskil het.

FIGUUR 5: Gemiddelde groeikoers (millimeters per dag) van saailinge van vyf plantsoorte wat vir vier weke aan 'n konsentrasiereeks van API-slik in potgrond blootgestel is: (a) *Phaseolus vulgaris* (boontjies); (b) *Zea mays* (mielies); (c) *Lactuca sativa* (slaai); (d) *Raphanus sativus* (rads) en (e) *Pennisetum clandestinum* (gras).

voortplanting was baie eners in verwysingsgrond en OECD-grond (2.50% en 2.66% onderskeidelik), maar minder gevoelig in LUFA2.2-grond (3.6%). Dit dui daarop dat grondtipe 'n belangrike rol speel om die uitwerking van die slik te beïnvloed. Achazi *et al.* (1999) het bevind dat individuele PAK's soos bensopireen en fluoranteen nie giftig is vir *Enchytraeus crypticus* in lae konsentrasies nie, maar Didden en

Römbke (2001) en Reinecke *et al.* (2016) het getoon dat die aard van die substraat of medium baie belangrik is. Eersgenoemde outeurs het bevind dat al is die LWEK-waarde vir bensopireen (1 mg/kg) en fluoranteen (10 mg/kg) vir voortplanting laag in 'n agar-medium, dit kan toeneem tot meer as 100 mg/kg indien die medium verander word na grond. Omdat die sensitiwiteit van spesies buitendien ook kan verskil (Dorn

TABEL 4: Gemiddeld (\pm standaardafwyking) van die waterinhoud (mg) van saailinge van vyf plantspesies wat aan 'n konsentrasiereeks van API-slik in potgrond blootgestel is.

| Plantspesies | Waterinhoud (mg) | | Konsentrasie API-slik (%) | | | |
|--------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| | 0 | 0.5 | 2.5 | 5.0 | 10 | |
| Boontjies† | 2236.54 \pm 625.74 ^{a,b} | 2214.98 \pm 720.52 ^{c,d} | 4018.12 \pm 728.09 ^{a,c} | 3677.36 \pm 878.13 ^{b,d} | 3291.10 \pm 429.49 | |
| Mielies† | 3809.58 \pm 302.09 ^{a,b,c} | 2523.99 \pm 352.76 ^a | 3147.22 \pm 455.18 ^d | 2649.76 \pm 432.02 ^b | 2216.82 \pm 514.54 ^{c,d} | |
| Slaai‡ | 50.19 \pm 15.62 ^{a,b} | 28.31 \pm 1.95 ^{a,c} | 41.09 \pm 8.17 ^d | 44.45 \pm 11.91 ^e | 5.38 \pm 2.38 ^{b,c,d,e} | |
| Radys‡ | 410.22 \pm 85.74 ^{a,b,c,d} | 198.40 \pm 21.99 ^a | 235.06 \pm 15.26 ^b | 190.86 \pm 25.06 ^c | 186.61 \pm 30.93 ^d | |
| Gras‡ | 25.61 \pm 3.0 ^{a,b,c} | 17.03 \pm 7.42 ^{a,d,e} | 24.74 \pm 4.88 ^{f,g} | 5.62 \pm 3.17 ^{b,d,f} | 6.21 \pm 1.47 ^{c,e,g} | |

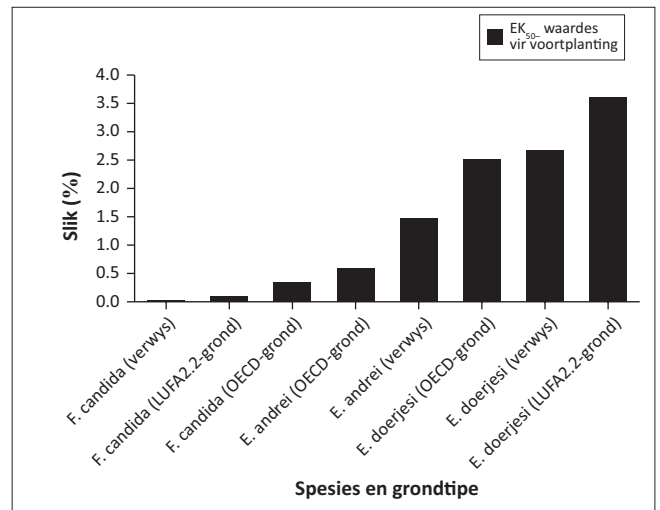
^{a, b, c, d, e, f}, eenderse simbole dui betekenisvolle verskille ($p \leq 0.05$) tussen behandelings aan vir 'n bepaalde spesie.

†, 4 weke blootstelling; ‡, 3 weke blootstelling.

et al. 1998; Sverdrup *et al.* 2002; Eom *et al.* 2007; Sverdrup *et al.* 2007; Wilke *et al.* 2008) kan veralgemenings oor die toksisiteit van die API-slik vir potwurms nie gemaak word nie.

Vermydingsgedrag van die potwurms

Die potwurms wat aan die verwysingsgrond aan weerskante van die houer blootgestel is, het 'n eweredige verspreiding tussen die twee kante getoon, maar hulle het die meer besoedelde grond van die noordelike deel van die landbewerkingsperseel statisties betekenisvol ($p < 0.05$) vermy. Hulle het ook die grond van die suidelike perseel verkies ($p < 0.05$) bo die verwysingsgrond, hoewel hulle nie besonder gevoelig was vir grond van die landbewerkingsperseel tydens die langtermyn-blootstellings nie. Amorim, Römbke en Soares (2005) en Achazi *et al.* (1999) het by die naverwante *Enchytraeus albidus* en *E. crypticus* (in reaksie op plaagmiddels en onkruidodders) aangetoon dat vermyding as toksisiteitseindpunt selfs meer gevoelig kan wees as voortplanting. Hund-Rinke *et al.* (2003) meen dat kontaminante as toksies beskou kan word indien die organismes 'n vermydingsrespons van meer as 80% vertoon. Hiervolgens kan 1% API-slik in die huidige studie as toksies geklassifiseer word. Indien die sensitiviteit van 'n spesie vir 'n spesifieke kontaminant of mengsel van stowwe bekend is, kan inligting oor vermydingsgedrag as 'n aanvullende assessering gebruik word om 'n vinnige en eenvoudige bevestiging te verkry in chroniese langtermyn-blootstellings. Hoewel die vermydingsrespons as 'n vroeë siftingsmetode in toekomstige assesserings van slikbewerkte grond gebruik kan word (Yearley *et al.* 1996; Hund-Rinke & Wiechering 2001; Natal-Da-Luz Ribeiro & Sousa 2004), word meer inligting vereis alvorens *E. doerjesi* as 'n geskikte toetspesie vir die doel bevestig kan word. Die vermydingsrespons van die potwurms word in Tabel 3 vergelyk met dié van twee ander grondlewende organismes uit vorige studies (Van Wyk 2010; Reinecke *et al.* 2015) waar soortgelyke blootstellings met dieselfde substrate gedoen is. Duidelike verskille tussen spesies kom dus voor hoewel die gevoelige vermyding van 1% slik in verwysings- of kontrolegrond opvallend eners is vir al drie spesies. Gegronde op dié en vorige studies kan die volgende rangorde (Figuur 6) vanaf die meeste tot die minste gevoelig, soos volg voorgehou word: *F. candida* voortplanting > *E. andrei* voortplanting (kokonproduksie) > *E. andrei* oorlewing > *E. doerjesi* voortplanting > *E. doerjesi* oorlewing. Die voortplanting van die potwurms is gevolglik 'n baie minder gevoelige eindpunt as dié van die springstert (*F. candida*) of die erdwurm (*E. andrei*) vir API-slik.



FIGUUR 6: Vergelyking van die effekonsentrasies (waar 50% van die voortplanting geïmpak is) van drie spesies naamlik: *E. doerjesi* (hierdie studie), *E. andrei* en *F. candida* (Reinecke *et al.* 2015) na blootstelling aan 'n konsentrasiereeks van API-slik in verskillende grondtipes.

Plantblootstellings

Die konsentrasies van API-slik wat deur die verskillende plantspesies verdra kon word, het baie verskil. Ook die waterinhoud van die plante het aansienlik gevarieer tussen verskillende blootstellingskonsentrasies. Plante het by konsentrasies van 10% en hoër begin doodgaan. Volgens Baker (1970) blokkeer die slik water- en suurstofopname, maar is koolwaterstowwe wel beskikbaar vir opname.

Die hoër ontkiemingskoers, groeiakoers, totale droë massa en waterinhoud van boontjies by 2.5% slik in vergelyking met die ongekontaminateerde kontrole, kan moontlik daarop dui dat matige kontaminasie met slik voordelige toestande vir hulle geskep het. In 'n vorige studie het Baker (1970) bevind dat sojabone se groei by selfs laer konsentrasies van olie gestimuleer word. Volgens dié outeur kan enkele stowwe in die API-slik optree as nabooters van voordelige stowwe en/of hormone om dit te bewerkstellig.

Die slik kan moontlik ook die samestelling van mikroörganismes in die grond gunstig beïnvloed (Nicolotti & Egli 1998). Daarbenewens kan die boontjies se stikstofbindende vermoë (vanweë simbiose met *Rhizobium*-spesies in die wortelknoppies) hulle in staat stel om meer ongunstige toestande te weerstaan (Van Berkum & Bohlool 1980).

Die hoë LWEK-waarde van boontjies (Figuur 5A) van meer as 10% API-slik dui op die hoë weerstandigheid en stem ooreen

met vorige bevindings (Adam & Duncan 1999; Ogbo 2009; Wyszowski & Ziolkowska 2009) dat boontjies potensiaal het as fitoremedieerders van koolwaterstofbesoedeling. Hoewel die groeikoers van mielies met toenemende konsentrasies van slik afgeneem het (Figuur 5b), het die ontkiemingsresultate getoon dat die sade nie besonder gevoelig was nie (Figuur 4b). Dit verskil van ander bevindings dat oliebesoedeling die ontkiemingsukses en groei van mielies nadelig beïnvloed (Ekundayo, Emede & Osayande 2001; Ogbo 2009; Basic *et al.* 2009). Aan die ander kant het Dorn *et al.* (1998) ook bevind dat mielies minder gevoelig as ander oesgewasse is vir ru-olie. Die lae LWEK-waarde vir biomassatoename (0.5% API-slik) dui egter daarop dat mielies se groei gevoelig reageer op slik.

Slaai se ontkiemingsukses (Figuur 4C) was baie gevoelig. Slaaisade is besonder temperatuurgevoelig en die temperatuur van 22 °C kon 'n invloed gehad het omdat Reynolds en Thompson (1971) voorgestel het dat 15 °C tot 18 °C as optimaal beskou moet word. Plaza *et al.* (2005) het slaai as baie gevoelig vir oliebesoedeling beskou. Die slaai in dié studie het egter by blootstelling aan middelvlakke van 2.5% en 5% API-slik nie statisties betekenisvol verskil van die ongekontamineerde kontrole nie.

Die ontkieming van radyssade het matig toegeneem met 'n toename in slik (Figuur 4d). Banks en Schultz (2005) het in teenstelling bevind dat ontkieming nie gevoelig vir petroleumbesoedeling is nie. Plante wat aan 10% API-slik bootgestel is, het 'n lae groeikoers, lae massa en lae waterinhoud gehad, waaruit afgelei word dat radyse nadelig beïnvloed is by slikkonsentrasies van 10% en hoër. Ontkieming van grassaad is nie vertraag deur toenemende blootstelling aan slik nie, hoewel die ontkiemingskoers in die kontrole laag was. Geen betekenisvolle verandering het in groeikoers en biomassa voorgekom nie, hoewel Adam en Duncan (1999) bevind het dat lae vlakke van dieselolie die groei van sommige grassoorte soos kanariegras (*Phalaris canariensis*) kan bevorder. Die hoë LWEK-waarde vir gras dui daarop dat gras nie gevoelig vir API-slik is nie. Die wateropname van alle plante, behalwe boontjies, het afgeneem met toenemende slikkonsentrasies. Aangesien wateropname deur koolwaterstowwe belemmer word (Baker 1970), kan dit die hoë mortaliteite verklaar by slaaiplante, wat normaalweg 'n hoë wateropname het (Reynolds & Thompson 1971).

By boontjies, radyse en gras is nóg die bogrondse nóg die ondergrondse groei betekenisvol deur die slik beïnvloed. Mielies het uitgebreide wortels in die ongekontamineerde kontrole gehad, maar die byvoeging van slik het volgens aanduidings die ontwikkeling van die wortelstelsel geïnhipeer. Radyse het nie lank genoeg gegroei om 'n sigbare ondergrondse stoororgaan te vorm nie, maar die bogrondse massa het afgeneem.

Volgens Nicolotti en Egli (1998) kan sommige mikroörganismes in die grond oorleef en vermeerder vanweë 'n hoë koolstofinhoud sodat hulle selfs met plante kan kompeteer vir stikstof en suurstof (Gudin & Syrratt 1975). Stikstofbindende plante, soos peulgewasse, kompeteer beter

in die teenwoordigheid van bykomende koolstofbronne en dit kan moontlik die groter weerstandigheid van boontjies in vergelyking met mielies en radyse verklaar (Wyszowski & Ziolkowska 2009). Achuba (2006) het bevind dat die byvoeging van 0.5% ru-olie by grond sellulêre en metaboliese aktiwiteit van swartbekboontjies (*Vigna unguiculata*) 'stimuleer'.

Slot

'n Vergelyking tussen potwurms met ander, voorheen getoetste, grondlewende spesies lei tot die volgende rangorde van gevoeligheid vanaf die meeste tot die minste gevoelig: *F. candida*, *E. andrei* en *E. doerjesi*. Die potwurms was in staat om die verskille in die vlakke van besoedeling tussen die noordelike en suidelike dele van die landbewerkingsperseel uit te wys, ondanks die feit dat hulle minder gevoelig is in terme van voortplanting en oorlewing as erdwurms en springsterre. Hoewel die grond van die landbewerkingsperseel nie akuut toksies vir die toetsorganismes was nie, het hulle nogtans duidelik bruikbare vermydingsgedrag getoon.

Die plantspesies is verskillend deur die slik geaffekteer en hoewel groei in sommige gevalle gestimuleer is deur die toevoeging van lae konsentrasies van slik, het dit by hoë konsentrasies 'n nadelige uitwerking op groei en ontwikkeling gehad. Dié en vorige studies het getoon dat bioassesserings met gronddiere en plante wel bykomende inligting kan verskaf wat ekologies relevant is vir die bepaling van die toksiese risiko van raffinadery-slik.

Die impak van mengsels van stowwe, soos wat in die landbewerkingsperseel voorkom, kan deur verskeie lokaliteitspesifieke faktore beïnvloed word sodat algemene gevolgtrekkings en aanbevelings oor toelaatbare konsentrasies van slik in landbewerkingspersele van olieraffinaderye nie sonder meer gemaak kan word nie. Elke situasie sal op eie meriete beoordeel moet word, tensy 'n meer omvattende modelleringsbenadering, soos deur McLaughlin *et al.* (2011) voorgestel, gevolg word en meer parameters ingesluit word in die assessering. Ook moet die rol van artefakte weens die kleinskaalse eksperimentele byvoeging van slik sowel as veroudering van die slik in die omgewing in ag geneem word.

Erkenning

Ons bedank Prof. P. Kramarz (Jagielloniese Universiteit, Pole) vir advies oor die teel van die potwurms. Die studie is moontlik gemaak deur die finansiële ondersteuning van die Universiteit van Stellenbosch, SASOL en die Nasionale Navorsingstigting (NNS). Die bevindinge en menings is dié van die outeurs.

Mededingende belange

Die skrywers verklaar dat hulle geen verhouding het wat hulle positief of negatief kon beïnvloed het by die skryf van hierdie artikel nie.

Outeurs bydrae

Die konseptuele ontwerp van die ondersoek is deur die A.J.R. gedoen in samewerking met S.A.R. Die aanvanklike literatuurstudie is deur M.v.W. gedoen en later opgedateer en uitgebrei deur A.J.R. Die laboratoriumproewe is deur M.v.W. onder toesig van A.J.R. en S.A.R. uitgevoer en laasgenoemde was vir die identifikasie en teling van die proefdiere verantwoordelik. M.v.W. het die plantproewe uitgevoer en die statistiese verwerking van alle gegewens gedoen. Al drie outeurs het die gegewens geïnterpreteer. A.J.R. het hierdie manuskrip in oorleg met die mede-outeurs geskryf.

Literatuurverwysings

- Achazi, R.K., Frölich, E., Henneken, M. & Pilz, C., 1999, 'The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta)'. *Newsletter on Enchytraeidae* 6, 117–126.
- Achuba, F.I., 2006, 'The effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings', *The Environmentalist* 26, 17–20. <http://dx.doi.org/10.1007/s10669-006-5354-2>
- Adam, G. & Duncan, H.J., 1999, 'Effect of diesel fuel on growth of selected plant species', *Environmental Geochemistry and Health* 21, 353–357. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006744603461>
- Adam, G. & Duncan, H., 2002, 'Influence of diesel fuel on seed germination', *Environmental Pollution* 120, 363–370. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00119-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00119-7)
- Amorim, M.J.B., Römbke, J. & Soares, A.M.V.M., 2005, 'Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of Benomyl, Carbendazim, Phenmedipham and different soil types', *Chemosphere* 59, 501–510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.057>
- Augulyte, L., Kliugaite, D., Racys, V., Jankunaite, D., Zaliauskiene, A., Andersson, P.L., et al., 2008, 'Chemical and ecotoxicological assessment of selected biologically activated sorbents for treating wastewater polluted with petroleum products with special emphasis on polycyclic aromatic hydrocarbons', *Water, Air and Soil Pollution* 195, 243–256. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-008-9743-7>
- Baker, J.M., 1970, 'The effects of oil on plants', *Environmental Pollution* 1, 27–44. [http://dx.doi.org/10.1016/0013-9327\(70\)90004-2](http://dx.doi.org/10.1016/0013-9327(70)90004-2)
- Banks, M.K. & Schultz, K.E., 2005, 'Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils', *Water, Air, and Soil Pollution* 167, 211–219. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-005-8553-4>
- Basic, F., Bertovic, L., Brkic, V., Durn, G., Kiscic, I., Mesic, M., et al., 'The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops', *Geoderma* 149, 209–216.
- Beyleich, A. & Achazi, R.K., 1999, 'Influence of low soil moisture on enchytraeids', *Newsletter on Enchytraeidae* 6, 49–58.
- Blankenship, D.W. & Larson, R.A., 1978, 'Plant growth inhibition by the water extract of a crude oil', *Water, Air and Soil Pollution* 10, 471–476. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00250012>
- Carpenter, D.O., Arcaro, K. & Spink, D.C., 2002, 'Understanding the human health effects of chemical mixtures', *Environmental Health Perspective*, 110, 25. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.02110s125>
- Cermak, J.H., Stephenson, G.L., Birkholz, D., Wang, Z., & Dixon, D.G., 2010, 'Toxicity of petroleum hydrocarbon distillates to soil organisms', *Environmental toxicology and chemistry*, 29, 2685–2694. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.352>
- Chapman, E.E.V., Helmer, S.H., Dave, G. & Murimboh, J.D., 2012, 'Utility of bioassays (lettuce, red clover, red fescue, *Microtox*, MetSTICK, *Hyalella*, bait lamina) in ecotoxicological risk screening of acid metal (Zn)', *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 31–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.025>
- Da Silva, F.M.R. (Jr.), Da Silva, P.F., Guimaraes, F.S., De Almeida, K.A., Baisch, P.R.M. & Muccillo-Baisch, A.L., 2014, 'Ecotoxicological tools for landfarming soil evaluation in a petrochemical complex area', *Pedosphere* 24, 280–284. [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60014-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60014-X)
- Dawson, J.J.C., Godsiffe, E.J., Thomson, I.P., Ralebitso-Senior, T.K., Killham, K.S. & Paton, G.I., 2007, 'Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils', *Soil Biology & Biochemistry* 39, 164–177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.06.020>
- Day, P.R., 1956, 'Report of the Committee on Physical Analysis 1954–1955', *Soil Science Society of America Proceedings* 20, 167–169. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj1956.03615995002000020007x>
- Didden, W. & Römbke, J., 2001, 'Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems', *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50, 25–43. <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.2001.2075>
- Didden, W.A.M., 1992, 'Ecology of terrestrial *Enchytraeidae*', *Pedobiologia* 37, 2–29.
- Dorn, P.B. & Salanitro, J.P., 2000, 'Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation', *Chemosphere* 40, 419–426. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00304-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00304-5)
- Dorn, P.B., Vipond, T.E., Salanitro, J.P. & Wisniewski, H.L., 1998, 'Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox and plants', *Chemosphere* 31, 845–860. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00089-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00089-7)
- DWAF (Department of Water Affairs and Forestry), 1998, 'Minimum requirements for the handling, classification and disposal of hazardous waste', (2nd ed.), Department of Water Affairs and Forestry, Pretoria, South Africa.
- Ekundayo, E.O., Emede, T.O. & Osayande, D.I., 2001, 'Effects of crude oil spillage on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in soils of midwestern Nigeria', *Plant Foods for Human Nutrition* 56, 313–324. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011806706658>
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M. & Vasseur, P., 2007, 'Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil', *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 190–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.020>
- Eriyamremu, G.E., Asagba, S.O., Onyeki, E.C. & Aguebor-Ogie, B., 2007, 'Bonny light crude oil and its fractions alter radicle galactose dehydrogenase activity of beans and maize', *Trends in Applied Sciences Research* 2, 433–438. <http://dx.doi.org/10.3923/tasr.2007.433.438>
- Genou, G., Van Meenen, P., Van der Wert, H., De Nijs, W. & Verstraete, W., 1994, 'Degradation of oil sludge by landfarming – A case study at Ghent Harbour', *Biodegradation* 5, 37–46. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00695212>
- GRAPHPAD PRISM®, 2007, PRISM, version 5.0. www.graphpadprism.com
- Gudin, C. & Syrrat, W.J., 1975, 'Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination', *Environmental Pollution* 8, 107–112. [http://dx.doi.org/10.1016/0013-9327\(75\)90020-8](http://dx.doi.org/10.1016/0013-9327(75)90020-8)
- Haanstra, L., Doelman, P. & Oude Voshaar, J.H., 1985, 'The use of sigmoidal dose response curves in soil ecotoxicological research', *Plant and Soil* 84, 293–297. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02143194>
- Hamilton, M.A., Russo, R.C. & Thurston, R.V., 1977, 'Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays', *Environmental Science & Technology* 11, 714–719. <http://dx.doi.org/10.1021/es60130a004>
- Henner, P., Schiavon, M., Morel, J.L. & Lichtfouse, E., 1997, 'Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) occurrence and remediation methods', *Analysis Magazine* 25, 56–59.
- Hund-Rinke, K. & Wiechering, H., 2001, 'Earthworm avoidance test for soil assessments', *Journal for Soils and Sediment* 1, 15–20. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02986464>
- Hund-Rinke, K., Römbke, J., Achazi, R. & Warneke, D., 2003, 'Avoidance test with *E. fetida* as indicator for the habitat function of soils – Results of a laboratory comparison test', *Journal for Soils and Sediment* 3, 7–12. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02989462>
- Kramarz, P.E., Zwolak, M. & Laskowski, R., 2005, 'Effect of interaction between density dependence and toxicant exposure on population growth rate of the potworm *Enchytraeus daerjesi*', *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 537–540. <http://dx.doi.org/10.1897/04-263R.1>
- Kuperman, R.G., Amorim, M.J.B., Römbke, J., Lanno, R., Checkai, S.G., Dodard, R.T., et al., 2006, 'Adaptation of the enchytraeid toxicity test for use with natural soil types', *European Journal of Soil Biology*, 42, 234–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.07.028>
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K. & Basta, N., 2004, 'The bioavailability of chemicals in soil for earthworms', *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 39–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.014>
- Loehr, R.C. & Webster, M.T., 1996, 'Performance of long-term, field-scale bioremediation processes', *Journal of Hazardous Materials* 50, 108–128. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3894\(96\)01797-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3894(96)01797-9)
- McLaughlin, M.J., Lofts, S., Warne, M.St.J., Amorim, M.J.B., Fairbrother, A., Lanno, R., et al., 2011, 'Derivation of ecologically based soil standards for trace elements', in *Soil quality standards for trace elements*, E. Merrington, & I. Schoeters, (eds.), Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL.
- Memis, D., Çelikkale, M.S. & Ercan, E., 2004, 'The effect of different diets on the white worm (*Enchytraeus albidus* Henle, 1837) reproduction', *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 4, 5–7.
- Natal-Da-Luz, T., Ribeiro, R. & Sousa, J.P., 2004, 'Avoidance tests with *Collembola* and earthworms as early screening tool for site-specific assessment of polluted soils', *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 2188–2193. <http://dx.doi.org/10.1897/03-445>
- Natal-Da-Luz, T., Römbke, J. & Sousa, J.P., 2008, 'Avoidance tests in site-specific risk assessment – Influence of soil properties on the avoidance response of *Collembola* and earthworms', *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1112–1117. <http://dx.doi.org/10.1897/07-386.1>
- Nicolotti, G. & Egli, S., 1998, 'Soil contamination by crude oil: Impact on the mycorrhizosphere and on the revegetation potential of forest trees', *Environmental Pollution* 99, 37–43. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00179-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00179-6)
- OECD, 2004a, 'Organization for Economic Cooperation and Development guideline for the testing of chemicals, 222', *Earthworm reproduction test* Eisenia fetida andrei, Paris, France.
- OECD, 2004b, 'Organization for Economic Cooperation and Development guideline for testing of chemicals, 220', *Enchytraeidae Reproduction Test*, Paris, France.
- OECD, 2006, 'Organization for Economic Cooperation and Development guideline for the testing of chemicals, 208', *Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test*, Paris, France.
- OECD, 2009, 'Organization for Economic Co-operation and Development guideline for testing of chemicals, 232', *Collembolan Reproduction Test in Soil*, Paris, France.
- Ogbo, E.M., 2009, 'Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants – *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*', *African Journal of Biotechnology* 8, 250–253.

- PASW, 2009, SPSS Inc. for Windows, version 18.0.0. www.SPSS.com
- Pearce, K. & Ollermann, R.A., 1998, 'Status and scope of bioremediation in South Africa', *Bioremediation: Principles and Practice-Bioremediation Technologies* 3, 155–182.
- Perez, J.D. & Gallardolara, F., 1986, 'Effects of wastewater from olive processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species', *Journal of Environmental Science and Health* B21, 349–357. <http://dx.doi.org/10.1080/03601238609372529>
- Plaza, G., Nalecz-Jawęć, G., Ulf, K. & Brigmon, L., 2005, 'The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation', *Chemosphere* 59, 289–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.049>
- Punnaruttanakun, P., Meeyo, V., Kalambaheti, C., Rangsunvigit, P., Rirksomboon, T. & Kitiyanan, B., 2003, 'Pyrolysis of API separator sludge', *Journal of Annual Applications of Pyrolysis* 68–69, 547–560. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2370\(03\)00033-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2370(03)00033-0)
- Reynolds, T. & Thompson, P.A., 1971, 'Characterisation of the high temperature inhibition of germination of lettuce (*Lactuca sativa*)', *Physiologia Plantarum* 24, 544–547. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1971.tb03532.x>
- Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., Van Wyk, M., 2015, 'Kan die gevoeligheid van grondlewende organismes gebruik word om die toksisiteit van olieraffinaderyafval te beoordeel?', *SA Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie* 34(1) 76–89. <http://dx.doi.org/10.4102/satnt.v34i1.1308>
- Reinecke, A.J., Van Wyk, M. & Reinecke, S.A., 2016, 'The influence of soil characteristics on the toxicity of oil refinery waste for the springtail *Folsomia candida* (Collembola)', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 96, 804–809. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-016-1792-9>
- Römbke, J., Jänsch, S., Junker, T., Pohl, B., Scheffczyk, A. & Schlüss, H.J., 2006, 'Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtail, and plants for the assessment of metals in natural soils', *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 776–787. <http://dx.doi.org/10.1897/04-584R.1>
- Römbke, J. & Moser, T.H., 2002, 'Validating the enchytraeid reproduction test: Organisation and results of an international ringtest', *Chemosphere* 46, 1117–1140. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00113-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00113-8)
- Rubinos, D.A., Villasuso, R., Muniategui, S., Barral, M.T. & Diaz-Ferros, F., 2007, 'Using the landfarming technique to remediate soils contaminated with hexachlorocyclohexane isomers', *Water, Air and Soil Pollution* 181, 385–399. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-006-9309-5>
- Rushton, D.G., Ghaly, A.E. & Martinell, K., 2007, 'Assessment of Canadian regulations and remediation methods for diesel oil contaminated soils', *Annals of Applied Biology* 4, 465–478. <http://dx.doi.org/10.3844/ajassp.2007.465.478>
- Shie, J., Chang, C., Lin, J., Wu, C. & Lee, D., 2000, 'Resources recovery of oil sludge by pyrolysis: Kinetics study', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75, 443–450. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-4660\(200006\)75:6<443::AID-JCTB228>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/1097-4660(200006)75:6<443::AID-JCTB228>3.0.CO;2-B)
- Spurgeon, D.J., Weeks, J.M. & Van Gestel, C.A.M., 2003, 'A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology', *Pedobiologia* 47, 588–606. <http://dx.doi.org/10.1078/0031-4056-00234>
- STATSOFT, 2010, STATISTICA (data analysis software system), version 9.0. www.statsoft.com
- Sverdrup, L.E., Jensen, J., Kelley, A.E., Krogh, P.H. & Stenersen, J., 2002, 'Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Clitellata)', *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 109–114. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620210116>
- Sverdrup, L.E., Hagen, S.B., Krogh, P.H. & Van Gestel, C.A.M., 2007, 'Benzo(a)pyrene shows low toxicity to three species of terrestrial plants, two soil invertebrates, and soil-nitrifying bacteria', *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 362–368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.01.007>
- Tan, K.H., 2005, *Soil sampling, preparation, and analysis*, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida.
- Toxrat, 2003, Software for the statistical analysis of biotests, ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Germany.
- Van Berkum, P. & Bohloul, B.B., 1980, 'Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses', *Microbiological reviews* 44, 491–517.
- Van Gestel, C.A.M., Van der Waarde, J.J., Derksen, J.G.M., Veul, M.F.X.W., Bouwens, S., Rusch, B. et al., 2001, 'The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils', *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, 1438–1449. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620200705>
- Van der Watt, V.H., 1966, 'Improved tables and a simplified procedure for soil particle analysis by hydrometer method', *South African Journal of Agriculture* 9, 911–916.
- Van Wyk, M., 2010, 'Evaluating the toxic effects of industrial waste from a historic landfarming site using bioassays', M.Sc. unpublished dissertation, University Stellenbosch, Stellenbosch.
- Vidali, M., 2001, 'Bioremediation. An overview', *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163–1172. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Westheide, W. & Graeffe, U., 1992, 'Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida)', *Journal of Natural History* 26, 479–488. <http://dx.doi.org/10.1080/00222939200770311>
- Wilke, B.M., Riepert, F., Koch, C. & Kühne, T., 2008, 'Ecotoxicological characterization of hazardous wastes', *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 283–293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.003>
- Wyszkowski, M. & Ziolkowska, A., 2009, 'Role of compost, bentonite and calcium oxide in restricting the effect of soil contamination with petrol and diesel oil on plants', *Chemosphere* 74, 860–865. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.035>
- Yardley, R.B. Jr., Lazprchak, J.M. & Gast, L.C., 1996, 'The potential of an earthworm avoidance test for the evaluation of hazardous waste sites', *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1532–1537. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620150915>